

別表5  
(3)

## 主 論 文 要 旨

No.1

報告番号	甲 乙 第 号	氏 名	會田 宗司
主 論 文 題 名 : 新規水溶性置換基付加 phthalimide 誘導体 PEG(E)-TC11 を用いたハイリスク骨髄腫克服に関する研究			
<p>(内容の要旨)</p> <p>多発性骨髄腫 (multiple myeloma; MM)はB細胞の最終分化段階である形質細胞の異常増殖を特徴とする難治性造血器腫瘍である。MM は全造血器腫瘍患者のうちの約 13% を占め、造血器腫瘍のなかで悪性リンパ腫に次いで患者数の多い疾患である。MM の患者背景の特徴として、患者の約 3 分の 2 が 65 歳以上の高齢者である点が挙げられる。また、MM の呈する症状は多岐に渡っており、造血器障害に起因する貧血、悪性化した形質細胞が産生する M タンパクの増加に伴う腎障害、アミロイドーシス、破骨細胞の活性化と骨芽細胞の機能低下を原因とする融解性骨病変及び高カルシウム血症、易感染性等が挙げられる。</p> <p>MM 患者に対する治療は近年大きく変化している。2000 年代以降に上市された、プロテアソーム阻害薬 (Proteasome inhibitors; PIs)の Bortezomib, Carfilzomib, Ixazomib や、免疫調節薬 (Immunomodulatory drugs; IMiDs)の Thalidomide, Lenalidomide, Pomalidomide は MM の治療薬として中心的な役割を担っている。しかし、IMiDs には臨床上 2 つの大きな問題がある。1 点目は催奇形性が懸念される点である。2010 年に IMiDs の結合タンパク質として E3 ユビキチンリガーゼ複合体の構成タンパク質である Celebron (CRBN)が同定され、IMiDs の催奇形性及び抗腫瘍メカニズムが CRBN を介するものであることが報告されている。2 点目は 4 番染色体と 14 番染色体の転座 (t(4;14))、17 番染色体の欠失 (del17p13)、14 番染色体と 16 番染色体の転座 (t(14;16))、1 番染色体の増幅 (+1q21) などのハイリスク染色体異常を有する MM 患者の予後は IMiDs を用いても依然として不良のままである点である。これらの理由から催奇形性を有さず、ハイリスク染色体異常を有する MM 細胞に対しても効果のある新規治療薬が求められている。</p> <p>我々はこれまでに新規 phenylphthalimide 誘導体の TC11 が <i>in vivo</i>, <i>in vitro</i>においてハイリスクの染色体異常を有する MM 細胞に対してアポトーシスを誘導すること、破骨細胞の分化を抑制することを見出している。さらに、無細胞翻訳系を用いた遺伝子型と表現型の対応付け手法である <i>in vitro</i> virus 法により TC11 の結合タンパク質として、</p>			

細胞骨格を構成するタンパク質の一つである  $\alpha$ -tubulin および中心体複製や細胞周期調節に関与する nucleophosmin 1 (NPM1)を見出している。しかし、TC11 は水溶性が低く、骨髄腫担癌マウスに対し腹腔内投与を行った際の血中移行性が不良であるという問題があった

そこで本研究では TC11 の水溶性、血中移行性を改善するために、水溶性の高い polyethylene glycol (PEG)をエステル結合により TC11 に付加した新規化合物 PEG(E)-TC11 を合成し評価を行った。

まず、PEG を付加することによりどの程度水溶性が改善したのかを判断するために TC11, PEG(E)-TC11 の過飽和水溶液を作成し、HPLC により濃度を測定した。TC11 は非常に低い水溶性 (2 mg/100 mL)を示したが、PEG 化することで水溶性は約 4500 倍 (8894 mg/100 mL)に向上した。

PEG(E)-TC11 は生体内においては PEG と TC11 とを繋ぐエステル結合が切断され、HOEtO-TC11 の形で存在する。PEG(E)-TC11 を 10% FBS 含有 RPMI1640 で溶解したところ、時間依存的に HOEtO-TC11 へと加水分解されていることが確認された。

次に PEG 化が、TC11 の細胞増殖抑制能に影響を及ぼすかどうかを、MTT 法により評価した。MM 細胞に TC11, PEG(E)-TC11, HOEtO-TC11 を 48 時間処理したところ、濃度依存的に細胞増殖能が抑制されていることが確認された。興味深いことに、PEG(E)-TC11, HOEtO-TC11 で処理した細胞は TC11 処理細胞と比べてより強く細胞増殖が阻害されることが確認された。また、flow cytometry 及び抗 cleaved caspase3 抗体、抗 Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)抗体を用いた Western blot 法によりこれらの化合物はアポトーシスを誘導することが確認された。

次に *in vivo* における抗腫瘍効果を確認するためにハイリスク染色体異常を有する KMS11 の皮下 xenograft モデルマウスを用いて検討を行った。コントロールマウスと比較して TC11 投与群、PEG(E)-TC11 投与群において顕著に腫瘍増大速度の抑制が確認された。そして、PEG(E)-TC11 投与群は TC11 投与群と比較して腫瘍増大速度がより強く抑制されている傾向が確認され、PEG(E)-TC11 投与群において完全に腫瘍が消失した個体も確認された。xenograft を用いた病理組織学的検討では PEG(E)-TC11 投与群の腫瘍において HE 染色では核の凝集が観察されたのに加えて、免疫組織化学的に Cleaved PARP, Cleaved Caspase 3, ssDNA の増加が観察され、PEG(E)-TC11 の投与によりアポトーシスが誘導されていることが確認された。

PEG(E)-TC11 投与群において TC11 投与群と比較して腫瘍増大速度が遅延している傾向が見られたのは、TC11 を PEG 化したことにより薬物血中濃度に変化が生じたためではないかと考え、TC11, PEG(E)-TC11 投与後の血中動態を HPLC により測定した。

ICR マウスに対し TC11, PEG(E)-TC11 をそれぞれ 186  $\mu\text{M}/\text{kgBW}$  単回腹腔内投与を行ったところ、PEG 化により最高血中濃度 ( $C_{\text{max}}$ )は 2.6  $\mu\text{M}$  から 24.4  $\mu\text{M}$  と約 8 倍増加し、血中半減期 ( $t_{1/2}$ )は 1.4 時間から 2.2 時間と約 1.8 倍延長していた。

さらに、PEG(E)-TC11 が MM 細胞の細胞死を誘導するメカニズムを解明するために、細胞周期解析を行った。MM 細胞株の KMS34, MUM24 に TC11, PEG(E)-TC11, HOEtO-TC11 を 3  $\mu\text{M}$  で処理したところ、顕著に G2/M 期の細胞分画が増加していることが確認された。また、本検討においても PEG(E)-TC11, HOEtO-TC11 を処理した細胞では TC11 処理細胞に比べてより顕著に G2/M 期の細胞分画が増加していた。

ハイリスク MM の一部では TP53 腫瘍抑制遺伝子が存在する 17 番染色体の欠損 (del17p)を示すことが報告されている。TP53 は細胞周期の G1/S チェックポイントで中心的な役割を果たしている。Lenalidomide を始めとする多くの MM 治療薬は G1/S arrest からの apoptosis を誘導する。しかし、TP53 欠損 MM 細胞では G1/S arrest が起こらず、細胞死の誘導も起こりにくい。一方、TC11 誘導体は G2/M 期での細胞周期停止を来とし、その作用は TP53 非依存的であると考えられる。従って TC11 およびその誘導体は TP53 欠損を有するハイリスク MM にも有効と考えられた。

これまでの研究によって、Thalidomide やその誘導体である Lenalidomide, Pomalidomide の催奇形性が CRBN との結合により引き起こされること、そしてその CRBN との結合が Thalidomide やその誘導体に共通している glutarimide 環を介していることが明らかとなっている。TC11 やその誘導体は glutarimide 環が diisopropylphenyl 環に置き換わっているため、CRBN と結合する可能性は低いと考えられていた。今回、BIACORE を用いて、化合物-タンパク質相互作用の解析を行った。Thalidomide, Lenalidomide は濃度依存的に CRBN との結合を増強したが、TC11, PEG(E)-TC11, HOEtO-TC11 は濃度を上げても CRBN との結合は確認されなかった。

本研究によって、PEG(E)-TC11 が *in vitro*, *in vivo* の両方においてハイリスク染色体異常を有する MM に対しても有効であること、その薬理メカニズムは既存の IMiDs と異なり、CRBN 非依存的に G2/M 期で細胞周期を停止させることでアポトーシスを誘導していることが示された。

以上より、PEG(E)-TC11 が t(4;14)や del17p 等のハイリスク染色体異常を有する MM を克服する新規治療薬候補化合物として期待される。